

⑬



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

⑪ Veröffentlichungsnummer:

0 227 938
A2

⑫

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

⑰ Anmeldenummer: **86116140.4**

⑤① Int. Cl.⁴: **C 12 P 21/02, C 12 N 15/00,**
C 12 N 1/20

⑱ Anmeldetag: **21.11.86**

③① Priorität: **27.11.85 DE 3541856**

⑦① Anmelder: **HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT,**
Postfach 80 03 20, D-6230 Frankfurt am Main 80 (DE)

④③ Veröffentlichungstag der Anmeldung: **08.07.87**
Patentblatt 87/28

⑧④ Benannte Vertragsstaaten: **AT BE CH DE ES FR GB GR**
IT LI LU NL SE

⑦② Erfinder: **Habermann, Paul, Dr., Helmchenweg 80,**
D-6230 Frankfurt am Main 80 (DE)
Erfinder: **Wengenmayer, Friedrich, Dr., Am**
Seyenbach 38, D-6238 Hofheim am Taunus (DE)

⑤④ **Eukaryotische Fusionsproteine, ihre Herstellung und Verwendung sowie Mittel zur Durchführung des Verfahrens.**

⑤⑦ Ein «öffener Leseraster» aus der DNA, die für Interleukin-2 (IL-2) codiert, eignet sich zur Herstellung von Fusionsproteinen. Hierfür genügt eine Teilsequenz der DNA, die etwa den ersten 100 Aminosäuren des IL-2 entspricht. Das Gen für das gewünschte Protein kann vor oder nach den offenen Leseraster gesetzt werden. Man erhält schwer- bis unlösliche Fusionsproteine, die leicht von den löslichen wirtseigenen Proteinen abgetrennt werden können.

EP 0 227 938 A2

Eukaryotische Fusionsproteine, ihre Herstellung und Verwendung sowie Mittel zur Durchführung des Verfahrens

Die Erfindung bezieht sich auf einen "offenen Leseraster"
5 aus einer DNA, die für Interleukin-2 codiert, und die Verwendung dieser DNA als Expressionshilfe zur Expression von Peptiden bzw. Proteinen.

Bei der gentechnischen Herstellung eukaryotischer Proteine
10 wird in Bakterien häufig nur eine geringe Ausbeute erhalten, insbesondere bei kleinen Proteinen mit einem Molgewicht bis zu etwa 15 000 Dalton, deren Strukturen Disulfidbrücken enthalten. Man nimmt an, daß die gebildeten Proteine durch wirtseigene Proteasen rasch abgebaut werden.
15 Man konstruiert deshalb zweckmäßig Genstrukturen, die für Fusionsproteine codieren, wobei der unerwünschte Anteil des Fusionsproteins ein wirtseigenes Protein ist, das nach der Isolation der Primärproduktes nach an sich bekannten Methoden abgespalten wird.

20 Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß ein N-terminaler Anteil von Interleukin-2, der im wesentlichen den ersten 100 Aminosäuren entspricht, besonders gut zur Herstellung von Fusionsproteinen geeignet ist. Man erhält
25 also als Primärprodukt ein Fusionsprotein, das völlig oder zum ganz überwiegenden Teil aus eukaryotischen Proteinsequenzen besteht. Überraschenderweise wird dieses Protein offenbar in dem betreffenden Wirtsorganismus nicht als Fremdprotein erkannt und nicht sofort wieder abgebaut. Ein
30 weiterer Vorteil ist, daß die erfindungsgemäßen Fusionsproteine schwer löslich bis unlöslich sind und sich somit einfach, zweckmäßig durch Zentrifugation, von den löslichen Proteinen abtrennen lassen.

35 Da es erfindungsgemäß hinsichtlich der Funktion als "Ballast-Anteil" des Fusionsproteins nicht darauf ankommt, daß

der Interleukin-2-Anteil ein biologisch aktives Molekül darstellt, kommt es insofern auch nicht auf die exakte Struktur des Interleukin-2-Anteils an. Es genügt hierfür, daß im wesentlichen die ersten 100 N-terminalen Aminosäuren vorliegen. Es ist also beispielsweise möglich, am N-Terminus Variationen vorzunehmen, die eine Spaltung des Fusionsproteins erlauben, falls das erwünschte Protein N-terminal dazu angeordnet ist. Umgekehrt kann man C-terminal Variationen vornehmen, um die Abspaltung des gewünschten Proteins zu ermöglichen oder zu erleichtern, falls dieses im Fusionsprotein - wie üblich - C-terminal gebunden ist.

Die für Human-Interleukin-2, im folgenden "IL-2", codierende natürliche DNA-Sequenz ist aus der europäischen Patentanmeldung mit der Veröffentlichungsnummer EP-A1-O 091 539 bekannt. Die dort aufgeführte Literatur bezieht sich auch auf Mäuse- und Ratten-IL-2. Diese Säuger-DNA kann zur Synthese der erfindungsgemäßen Proteine herangezogen werden. Zweckmäßiger geht man jedoch von einer synthetischen DNA aus, besonders vorteilhaft von der DNA für Human-IL-2, die in der (nicht vorveröffentlichten) deutschen Offenlegungsschrift 34 19 995 (entsprechend der unter der Nummer O 163 249 veröffentlichten europäischen Patentanmeldung) vorgeschlagen wurde. Diese synthetische DNA-Sequenz ist im Anhang wiedergegeben (DNA-Sequenz I). Diese synthetische DNA hat nicht nur den Vorzug, daß sie in der Codon-Wahl auf die Gegebenheiten des am häufigsten verwendeten Wirts, E. coli, abgestimmt ist, sondern sie enthält auch eine Reihe von Schnittstellen für Restriktionsendonucleasen, von denen erfindungsgemäß Gebrauch gemacht werden kann. In der folgenden Tabelle 1 ist eine Auswahl der geeigneten Schnittstellen am Anfang bzw. in der Region des 100. Triplets wiedergegeben. Hierdurch ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß in dem dazwischenliegenden Bereich Variationen in der DNA vorgenommen werden, wobei von den in der vorstehend genannten Patentanmeldung aufgeführten weiteren Schnittstellen Gebrauch gemacht werden kann.

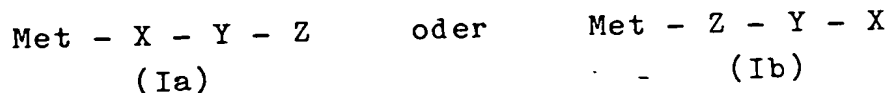
Tabelle 1

5	Restriktionsenzym	Erkennungs- sequenz	Position des ersten Nucleotids der Er- kennungssequenz (codierender Strang)
		5' 3'	
10	Aha II, Ban I,		
	Hae II, Nar I,	GGCGCC	8
	Ban II, Sac I, Sst I	GAGCTC	291
	Hha I	GCGC	9
	Hinf I	GACTC	35
	Pvu I	CGATCG	346
15	Taq I	TCGA	387

Wird von den Nucleasen Ban II, Sac I oder Sst I Gebrauch gemacht, so erhält man eine IL-2-Teilsequenz, die für etwa 95 Aminosäuren codiert. Diese Länge ist im allgemeinen ausreichend, um ein unlösliches Fusionsprotein zu erhalten. Wenn die Schwerlöslichkeit, beispielsweise bei einem gewünschten hydrophilen eukaryotischen Protein, noch nicht ausreicht, man aber - um so wenig "Ballast" wie möglich zu produzieren - nicht von den näher am C-Terminus liegenden Schnittstellen Gebrauch machen will, so kann man durch entsprechende Adapter bzw. Linker die DNA-Sequenz am N- und/oder C-terminalen Ende verlängern und so den "Ballast"-Anteil "maßschneidern". Man kann natürlich auch die DNA-Sequenz - mehr oder weniger - bis zum Ende nutzen und so - gegebenenfalls modifiziertes - biologisch aktives IL-2 als "Nebenprodukt" erzeugen bzw. ein bifunktionelles Protein erzeugen, das IL-2 Wirkung zusätzlich zur Wirkung des codierten Proteins zeigt.

35

Die Erfindung betrifft somit Fusionsproteine der allgemeinen Formel



- 5 in der X im wesentlichen die Aminosäurefolge der etwa 100
ersten Aminosäuren von vorzugsweise menschlichem IL-2 be-
deutet, Y eine direkte Bindung bedeutet, falls die zum ge-
wünschten Protein benachbarte Aminosäure oder Aminosäuren-
folge eine Abspaltung des gewünschten Proteins ermöglicht,
10 oder andernfalls ein Brückenglied aus einer oder mehreren
genetisch codierbaren Aminosäuren, das die Abspaltung er-
möglicht, und Z eine Sequenz aus genetisch codierbaren
Aminosäuren ist, die für das gewünschte Protein codiert.
- 15 Wie sich aus den Formeln Ia und Ib ergibt - und wie es
auch schon vorstehend erwähnt wurde - ist es möglich, das
gewünschte Protein vor oder nach dem IL-2-Anteil zur Ex-
pression zu bringen. Zur Vereinfachung wird im folgenden
im wesentlichen die erste Möglichkeit erläutert, die der
20 herkömmlichen Methode zur Herstellung von Fusionsproteinen
entspricht. Wenn also im folgenden diese "klassische" Va-
riante beschrieben wird, soll die andere Alternative hier-
durch nicht ausgeschlossen werden.
- 25 Die Spaltung des Fusionsproteins kann in an sich bekannter
Weise chemisch oder enzymatisch erfolgen. Die Wahl der ge-
eigneten Methode richtet sich vor allem nach der Amino-
säuresequenz des gewünschten Proteins. Wenn dieses bei-
spielsweise kein Methionin enthält, kann Y Met bedeuten,
30 worauf eine chemische Spaltung mit Chlor- oder Bromcyan
erfolgt. Steht im Bindeglied Y am Carboxyterminus Cystein
oder steht Y für Cys, so kann eine enzymatische Cystein-
spezifische Spaltung oder eine chemische Spaltung, bei-
spielsweise nach spezifischer S-Cyanylierung, folgen.
- 35 Steht im Brückenglied Y am Carboxyterminus Tryptophan oder
Y für Trp, so kann eine chemische Spaltung mit N-Brom-
succinimid erfolgen.

Proteine, die in ihrer Aminosäuresequenz nicht

Asp - Pro

5 enthalten und hinreichend säurestabil sein, können in an sich bekannter Weise proteolytisch gespalten werden. Hierdurch erhält man Proteine, die N-terminal Prolin bzw. C-terminal Asparaginsäure enthalten. Auf diese Weise können also auch modifizierte Proteine synthetisiert werden.

10

Die Asp-Pro-Bindung kann noch säurelabiler gestaltet werden, wenn dieses Brückenglied $(\text{Asp})_n\text{-Pro}$ bzw. $\text{Glu}-(\text{Asp})_n\text{-Pro}$ ist, wobei n 1 bis 3 bedeutet.

15 Beispiele für enzymatische Spaltungen sind ebenfalls bekannt, wobei auch modifizierte Enzyme mit verbesserter Spezifität eingesetzt werden können (vgl. C.S. Craik et al., Science 228 (1985) 291-297). Ist das gewünschte eukaryotische Peptid Proinsulin, so wählt man zweckmäßig als
20 Sequenz Y eine Peptidsequenz, bei der eine durch Trypsin abspaltbare Aminosäure (Arg, Lys) an die N-terminale Aminosäure (Phe) des Proinsulins gebunden ist, beispielsweise Ala-Ser-Met-Thr-Arg, da dann die Arginin-spezifische Spaltung mit der Protease Trypsin erfolgen kann.

25

Enthält das gewünschte Protein nicht die Aminosäurefolge

Ile-Glu-Gly-Arg,

30 so kann das Fusionsprotein mit Faktor Xa gespalten werden (europäische Patentanmeldungen mit den Veröffentlichungsnummern O 025 190 und O 161 973).

Das Fusionsprotein wird durch Expression in einem geeigneten Expressionssystem in an sich bekannter Weise gewonnen.
35 Hierfür eignen sich alle bekannten Wirts-Vektor-Systeme,

also beispielsweise Säugerzellen und Mikroorganismen, beispielsweise Hefen und vorzugsweise Bakterien, insbesondere E. coli.

5 Die DNA-Sequenz, die für das gewünschte Protein codiert, wird in bekannter Weise in einen Vektor eingebaut, der in dem gewählten Expressionssystem eine gute Expression gewährleistet.

10 In bakteriellen Wirten wählt man zweckmäßig den Promotor und Operator aus der Gruppe lac, tac, trp, P_L oder P_R des Phagen λ , hsp, omp oder einen synthetischen Promotor, wie sie beispielsweise in der deutschen Offenlegungsschrift 34 30 683 (Europäische Patentanmeldung mit der Veröffentlichungsnummer O 173 149) vorgeschlagen sind. Vorteilhaft
15 ist die tac Promotor-Operator-Sequenz, die inzwischen handelsüblich ist (z.B. Expressionsvektor pKK223-3, Pharmacia, "Molecular Biologicals, Chemicals and Equipment for Molecular Biology", 1984, S. 63).

20

Bei der Expression des erfindungsgemäßen Fusionsproteins kann es sich als zweckmäßig erweisen, einzelne Triplets der ersten Aminosäuren nach dem ATG-Start-Codon zu verändern, um eine eventuelle Basenpaarung auf der Ebene der
25 mRNA zu verhindern. Solche Veränderungen, ebenso wie Veränderungen, Deletionen oder Additionen einzelner Aminosäuren im IL-2-Proteinanteil, sind dem Fachmann geläufig und ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

30 In den folgenden Beispielen und in den Figuren wird die Erfindung näher erläutert. Hierbei beziehen sich

Figur 1 und deren Fortsetzung, Figur 1a, auf die Synthese des Plasmids pK360, das für ein Fusionsprotein codiert,
35 welches die Hirudinsequenz aufweist;

Figur 2 und ihre Fortsetzung, Figur 2a, betreffen die Synthese des Plasmids pK410, welches ebenfalls für ein Fusionsprotein mit der Aminosäuresequenz des Hirudin codiert,

Figur 3 und ihre Fortsetzungen, Figuren 3a bis 3c, auf die Konstruktion der Plasmide pPH15, 16, 20 und 30, die für Fusionsproteine codieren, die die Aminosäuresequenz von Affen-Proinsulin enthalten,

5

Figur 4 auf die Synthese des Plasmids pPH100, welches für ein Fusionsprotein mit der Aminosäuresequenz des Hirudin codiert,

- 10 Figur 5 und ihre Fortsetzung, Figur 5a, auf die Konstruktion des Plasmids pK370, welches für ein Fusionsprotein mit der Aminosäuresequenz des Hirudin codiert sowie

- Figur 6 und ihre Fortsetzung, Figur 6a, auf die Synthese
15 des Plasmids pKH101, das für ein Fusionsprotein mit der Aminosäurefolge von Affenproinsulin codiert.

- Die Figuren sind i.a. nicht maßstabgerecht gezeichnet, vor allem bei der Wiedergabe der Polylinker wurde der Maßstab
20 "gedehnt".

Beispiel 1

- Durch Insertion des lac-Repressors (P.J. Farabaugh, Nature
25 274 (1978) 765-769) in das Plasmid pKK 177-3 (Amann et al., Gene 25 (1983) 167) erhält man das Plasmid pJF118 (1)
(Fig. 1; vgl. deutsche Patentanmeldung P 35 26 995.2, Beispiel 6, Fig. 6). Dieses wird an der singulären Restriktionsstelle für Ava I geöffnet und in an sich bekannter
30 Weise durch Exonuclease-Behandlung um etwa 1000 bp verkleinert. Nach Ligierung wird das Plasmid pEW 1000 (2),
(Figur 1) erhalten, in dem das lac-Repressorgen vollständig erhalten ist, das aber auf Grund der Verkleinerung in deutlich höherer Kopienzahl als das Ausgangsplasmid vor-
35 liegt.

Anstelle des Plasmids pKK177-3 kann man auch von dem vor-

stehend erwähnten handelsüblichen Plasmid pKK223-3 ausgehen, den lac-Repressor einbauen und das erhaltene Produkt analog verkürzen.

- 5 Das Plasmid pEW 1000 (2) wird mit den Restriktionsenzymen EcoR I und Sal I geöffnet (3).

Das für Hirudin codierende Plasmid (4), hergestellt gemäß deutscher Offenlegungsschrift 34 29 430 (europäische Patentanmeldung mit der Veröffentlichungsnummer O 171 024),
10 Beispiel 4 (Figur 3), wird mit den Restriktionsenzymen Acc I und Sal I geöffnet und das kleine Fragment (5), das zum größten Teil die Hirudin-Sequenz enthält, isoliert.

- 15 Das Plasmid p159/6 (6), hergestellt gemäß deutscher Offenlegungsschrift 34 19 995 (europäische Patentanmeldung mit der Veröffentlichungsnummer O 163 249), Beispiel 4 (Figur 5), wird mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Pvu I geöffnet und das kleine Fragment (7) isoliert, das
20 den größten Teil der IL-2-Sequenz enthält. Diese Teilsequenz und im folgenden auch andere verkürzte IL-2 Sequenzen sind in den Figuren mit "ΔIL2" bezeichnet.

- Anschließend werden die Sequenzen (3), (5), (7) sowie die
25 synthetische DNA-Sequenz (8; Figur 1a) mit T4-Ligase behandelt. Man erhält das Plasmid pK360 (9).

Kompetente E. coli-Zellen werden mit dem Ligationsprodukt transformiert und auf NA-Platten, die 25 µg/ml Ampicillin
30 enthalten, ausplattiert. Die Plasmid-DNA der Klonen wird mittels Restriktions- und Sequenzanalyse charakterisiert.

Eine Übernachtskultur aus E. coli-Zellen, die das Plasmid (9) enthalten, wird mit LB-Medium (J. H. Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1972), das 50 µg/ml Ampicillin enthält, im Verhältnis
35 von etwa 1:100 verdünnt und das Wachstum über OD-Messung

verfolgt. Bei OD = 0,5 wird die Schüttelkultur auf 1 mM Isopropyl- β -galactopyranosid (IPTG) eingestellt und die Bakterien nach 150 bis 180 Minuten abzentrifugiert. Die Bakterien werden 5 Minuten in einer Puffermischung (7M Harnstoff, 0,1% SDS, 0,1 M Natriumphosphat, pH 7,0) gekocht und Proben auf eine SDS-Gelelektrophoreseplatte aufgetragen. Nach Elektrophorese wird aus Bakterien, die das Plasmid (9) enthalten, eine Proteinbande erhalten, die der Größe des erwarteten Fusionsproteins entspricht. Nach
10 Aufschluß der Bakterien (French Press; ^(R)Dyno-Mühle) und Zentrifugation befindet sich das Fusionsprotein im Niederschlag, so daß mit dem Überstand bereits erhebliche Mengen der übrigen Proteine abgetrennt werden können. Nach Isolierung des Fusionsproteins wird durch Bromcyan-Spaltung
15 das erwartete Hirudin-Peptid freigesetzt. Dieses wird nach Isolierung durch Protein-Sequenzanalyse charakterisiert.

Die angegebenen Induktionsbedingungen gelten für Schüttelkulturen; bei größeren Fermentationen sind entsprechend
20 veränderte OD-Werte und gegebenenfalls leicht variierte IPTG-Konzentrationen zweckmäßig.

Beispiel 2

25 Das Plasmid (4) (Figur 1) wird mit Acc I geöffnet und die überstehenden Enden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt. Anschließend wird mit Sac I geschnitten und das Fragment (10) isoliert, das den größten Teil der Hirudin-Sequenz enthält.

30

Der handelsübliche Vektor pUC 13 wird mit den Restriktionsenzymen Sac I und Sma I geöffnet und das große Fragment (11) isoliert.

35 Mittels T4-Ligase werden nun die Fragmente (10) und (11) zum Plasmid pK 400 (12) (Fig. 2) ligiert. Das Plasmid (12) ist in der Figur 2 zweimal dargestellt, wobei in der unteren

ren Darstellung die Aminosäuresequenz des so erhältlichen Hirudin-Derivats hervorgehoben wird.

Das Plasmid (4) (Figur 1) wird mit den Restriktionsenzymen
5 Kpn I und Sal I geöffnet und das kleine Fragment (13) isoliert, das die Hirudin-Teilsequenz enthält.

Das Plasmid (12) wird mit den Restriktionsenzymen Hinc II
und Kpn I umgesetzt und das kleine Fragment (14) isoliert,
10 das die Hirudin-Teilsequenz enthält.

Das Plasmid (9) (Figur 1a) wird mit EcoR I partiell gespalten, die freien Enden mit Klenow-Polymerase in einer fill-in-Reaktion aufgefüllt und mit Sal I geschnitten. Man
15 erhält das Derivat des Plasmids pK360 (15).

Durch Ligieren der Fragmente (3), (13), (14) und (15) erhält man das Plasmid pK410 (16), das in der Figur 2a zweifach dargestellt ist, wobei die untere Wiedergabe die Aminosäurefolge des Fusionsproteins und damit des nach Säure-
20 spaltung erhaltenen Hirudin-Derivats erkennen läßt.

Nach Expression und Aufarbeitung gemäß Beispiel 1 erhält man ein neues Hirudin-Derivat, das in den Positionen 1 und
25 2 die Aminosäuren Prolin und Histidin aufweist. Dieses Hirudin-Derivat zeigt die gleiche Aktivität wie das Naturprodukt gemäß deutscher Offenlegungsschrift 34 29 430, das in diesen Positionen die Aminosäuren Threonin und Tyrosin aufweist, ist jedoch stabiler gegen den Angriff von Amino-
30 peptidasen, woraus sich Vorteile bei der in-vivo-Anwendung ergeben können.

Beispiel 3

35 Der handelsübliche Vektor pBR 322 wird mit Bam H I geöffnet, wobei man das linearisierte Plasmid (17) erhält. Die freien Enden werden partiell unter Einsatz von dATP, dGTP

und dTTP aufgefüllt und das überstehende Nucleotid G mit S1-Nuclease abgebaut, wobei das pBR 322-Derivat (18) erhalten wird.

- 5 Das Hae III-Fragment (19) aus Affen-Proinsulin (Wetekam et al., Gene 19 (1982) 181) wird mit dem modifizierten Plasmid (18) ligiert, wobei das Plasmid pPH 1 (20) erhalten wird. Da die Insulin-Teilsequenz in das Tetracyclin-Gen eingesetzt wurde, sind die Klone, die dieses Plasmid
10 enthalten, nicht gegen Tetracyclin resistent und können so identifiziert werden.

Das Plasmid (20) wird mit Bam HI und Dde I geöffnet und das kleine Fragment (21) isoliert.

15

Zusätzlich wird aus der Affen-Proinsulinsequenz die Dde I-Pvu II-Teilsequenz (22) isoliert.

- Der Vektor pBR 322 wird mit Bam HI und Pvu II geöffnet und
20 das linearisierte Plasmid (23) isoliert.

- Durch Ligierung der Insulin-Teilsequenzen (21) und (22) mit dem geöffneten Plasmid (23) erhält man das Plasmid pPH5 (24). Dieses wird mit Bam HI und Pvu II geöffnet und
25 das kleine Fragment (25) isoliert.

Zur Ergänzung der Insulinstruktur wird die DNA-Sequenz (26) synthetisiert.

- 30 Der handelsübliche Vektor pUC 8 wird mit den Enzymen Bam HI und Sal I geöffnet und das Restplasmid (27) isoliert. Dieses wird mit den DNA-Sequenzen (25) und (26) zum Plasmid pPH 15 (28) ligiert. Dieses wird mit Sal I geöffnet und die überstehenden Enden aufgefüllt. Aus dem resultierenden Plasmidderivat (29) wird mit Bam HI die DNA-
35 Sequenz (30) abgespalten.

Der handelsübliche Vektor pUC 9 wird mit den Enzymen Bam HI und Sma I geöffnet und das große Fragment (31) isoliert. Dieses wird mit der DNA-Sequenz (30) ligiert, wobei das Plasmid pPH16 (32) erhalten wird.

5

Das Plasmid (32) wird mit Sal I geöffnet und das lineari-
sierte Plasmid (33) partiell mit dCTP, dGTP und dTTP auf-
gefüllt und das verbleibende Nucleotid T mit S1-Nuclease
abgespalten. Das so erhaltene Plasmidderivat (34) wird mit
10 Bam HI behandelt und aus dem Produkt (35) mit S1-Nuclease
der überstehende Einzelstrang entfernt, wobei das Plasmid-
derivat (36) erhalten wird.

Die stumpfen Enden des Plasmidderivats (35) werden zum
15 Plasmid pPH 20 (37) cyclisiert.

Kompetente E. coli Hb 101-Zellen werden mit dem Ligations-
gemisch transformiert und auf selektivem Medium ausplat-
tiert. Klone, die das gewünschte Plasmid enthalten, expri-
20 mieren Proinsulin, wobei von 70 getesteten Klonen 28 ra-
dioimmunologisch nachweisbares Proinsulin enthielten. Die
Plasmide werden ferner mittels DNA-Sequenzanalyse charak-
terisiert. Sie enthalten DNA, die vor dem Codon für die
erste Aminosäure der B-Kette (Phe) für Arginin codiert.

25

Das Plasmid (37) wird mit Hind III gespalten, die überste-
henden Enden aufgefüllt und mit Dde I nachgespalten. Das
kleine Fragment (38) wird isoliert.

30 Das Plasmid (28) (Figur 3a) wird mit Sal I und Dde I ge-
spalten und das kleine Fragment (39) abgetrennt.

Das Plasmid (9) (Figur 1a) wird zunächst mit Acc I gespal-
ten, die freien Enden aufgefüllt und mit Eco RI partiell
35 nachgespalten. Das Fragment (40), das die verkürzte IL-2-
Sequenz enthält, wird isoliert.

Das linearisierte Plasmid (3) (Figur 1) und die DNA-Segmente (38), (39) und (40) werden nunmehr zu dem Plasmid pPH 30 (41) ligiert. Dieses Plasmid codiert für ein Fusionsprotein, das im Anschluß an die Aminosäuren 1 bis 114 des IL-2 die folgende Aminosäuresequenz aufweist:

Asp-Phe-Met-Ile-Thr-Thr-Tyr-Ser-Leu-Ala-Ala-Gly-Arg.

Das Arginin als letzte Aminosäure dieses Brückengliedes Y ermöglicht die Abspaltung der Insulinketten mit Trypsin.

Ausgehend vom Plasmid (9) (Figur 1a) kann man auch auf folgendem Weg zum Plasmid (41) kommen:

Man öffnet (9) mit Acc I, füllt die überstehenden Enden auf, schneidet mit Sal I nach und ligiert das erhaltene Plasmidderivat (42) mit den Segmenten (3), (38) und (39).

Beispiel 4

20

Das Plasmid (6) (Figur 1) wird mit den Restriktionsenzymen Taq I und Eco RI geöffnet und das kleine Fragment (43) isoliert. Dieses Fragment wird mit der synthetisierten DNA-Sequenz (44) und den Segmenten (3) und (5) zum Plasmid pPH 100 (45) ligiert. Dieses Plasmid codiert für ein Fusionsprotein, bei dem auf die ersten 132 Aminosäuren des IL-2 das Brückenglied Asp-Pro und hierauf die Aminosäurefolge von Hirudin folgt. Die proteolytische Spaltung liefert somit ein modifiziertes, biologisch aktives IL-2', in dem in Position 133 an Stelle von Thr Asp enthalten ist, und ein Hirudin-Derivat, das N-terminal Pro vor der Aminosäuresequenz des Naturprodukts enthält. Auch dieses Produkt ist biologisch aktiv und im Vergleich zu dem Naturprodukt stabiler gegen den Angriff von Proteasen.

35

Das IL-2'-Hirudin-Fusionsprotein zeigt ebenfalls biologische Aktivität:

Im Zellproliferationstest mit einer IL-2-abhängigen Zelllinie (CTLL2) wurde biologische Aktivität gefunden.

5 Nach Denaturierung in 6 M Guanidiniumhydrochlorid-Lösung und anschließende Renaturierung in Pufferlösung (10 mM Tris-HCl, pH 8,5, 1 mM EDTA) wurde weiterhin hohe IL-2-Aktivität gefunden. Außerdem wurde die Gerinnungszeit von säurebehandeltem, mit Thrombin versetztem Blut nach Zugabe des Fusionsproteins verlängert.

10

Man erhält somit ein bifunktionelles Fusionsprotein.

Beispiel 5

15 Der handelsübliche Vektor pUC 12 wird mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Sac I geöffnet. In dieses linearisierte Plasmid (46) wird eine IL-2-Teilsequenz eingesetzt, die aus dem Plasmid (6) (Figur 1) mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Sac I herausgespalten wird. Diese Sequenz
20 (47) umfaßt die kompletten Tripletts für die ersten 94 Aminosäuren des IL-2. Durch Ligieren von (46) und (47) erhält man das Plasmid pK 300 (48).

Das Plasmid (9) (Figur 1a) wird mit Eco RI geöffnet, die
25 überstehenden Enden aufgefüllt und mit Hind III nachgespalten. Man isoliert das kleine Fragment (49), das im Anschluß an die für Hirudin codierende DNA-Sequenz einen Teil des Polylinkers aus pUC 12 enthält.

30 Das Plasmid (48) wird mit den Restriktionsenzymen Sma I und Hind III geöffnet und das große Fragment (50) isoliert. Durch Ligierung von (50) mit (49) erhält man das Plasmid pK 301 (51).

35 Mit dem Ligationsgemisch werden kompetente E. coli 294-Zellen transformiert. Klone, die das Plasmid (51) enthalten, werden durch Restriktionsanalyse charakterisiert. Sie

enthalten DNA, die im Anschluß an die Codons für die ersten 96 Aminosäuren des IL-2 Codons für ein Brückenglied von 6 Aminosäuren und darauf folgend die Codons für Hirudin enthalten.

5

Das Plasmid (51) wird mit Eco RI und Hind III umgesetzt und das Fragment (52) isoliert, das die DNA-Sequenz für das genannte eukaryotische Fusionsprotein enthält.

10 Das Plasmid (2) (Figur 1) wird mit Eco RI und Hind III geöffnet. Das erhaltene linearisierte Plasmid (53) wird mit der DNA-Sequenz (52) ligiert, wobei das Plasmid pK 370 (54) erhalten wird.

15 Wird das Plasmid (54) entsprechend Beispiel 1 in E. coli zur Expression gebracht, so erhält man ein Fusionsprotein, bei dem auf die ersten 96 Aminosäuren des IL-2 das Brückenglied

Ala-Gln-Phe-Met-Ile-Thr

20

und im Anschluß daran die Aminosäurefolge des Hirudin folgt.

Beispiel 6

25 Aus dem Plasmid (41) (Beispiel 3; Figur 3c) wird mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Hind III das DNA-Segment herausgespalten, das für Affenproinsulin codiert, und die überstehenden Enden aufgefüllt. Man erhält das DNA-Segment (55).

30

Das Plasmid (48) (Beispiel 5, Figur 5) wird mit Sma I geöffnet und mit Alkalischer Rinderphosphatase behandelt. Das so erhaltene linearisierte Plasmid (56) wird mit dem DNA-Segment (55) ligiert, wobei das Plasmid pK 302 (57) erhalten wird. E. coli 294-Zellen werden mit dem Ligationsgemisch transformiert, wobei Klone, die das gewünschte Plasmid enthalten, zunächst durch Restriktions- und dann durch Sequenzanalyse der Plasmid-DNA charakterisiert werden.

35

Aus dem Plasmid (57) wird mit Eco RI und Hind III das Segment (58) herausgespalten, das für IL-2 und Affenproinsulin codiert.

- 5 Das Plasmid (2) (Beispiel 1, Figur 1) wird ebenfalls mit Eco RI und Hind III gespalten und in das linearisierte Plasmid (3) das Segment (58) hineinligiert. Man erhält das Plasmid pKH 101 (59).
- 10 Die Expression gemäß Beispiel 1 führt zu einem Fusionsprotein, bei dem auf die ersten 96 Aminosäuren des IL-2 ein Brückenglied mit 14 Aminosäuren folgt (entsprechend Y im DNA-Segment (58)), woran sich die Aminosäurefolge des Affenproinsulins anschließt.

Anhang I: DNA-Sequenz des Interleukin-2

Triplet Nr.						0	1	2			
Aminosäure						Met	Ala	Pro			
Nucleotid Nr.						1	10				
Cod. Strang						5'	AA	TTC	ATG	GCG	CCG
nicht cod. Strang						3'		G	TAC	CGC	GGC
<hr/>											
3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Lys	Lys	Thr	Gln	Leu		
	20				30			40			
ACC	TCT	TCT	TCT	ACC	AAA	AAG	ACT	CAA	CTG		
TGG	AGA	AGA	AGA	TGG	TTT	TTC	TGA	GTT	GAC		
<hr/>											
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		
Gln	Leu	Glu	His	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Gln		
	50				60			70			
CAA	CTG	GAA	CAC	CTG	CTG	CTG	GAC	CTG	CAG		
GTT	GAC	CTT	GTG	GAC	GAC	GAC	CTG	GAC	GTC		
<hr/>											
23	24	25	26	27	28	29	30	31	32		
Met	Ile	Leu	Asn	Gly	Ile	Asn	Asn	Tyr	Lys		
	80				90			100			
ATG	ATC	CTG	AAC	GGT	ATC	AAC	AAC	TAC	AAA		
TAC	TAG	GAC	TTG	CCA	TAG	TTG	TTG	ATG	TTT		
<hr/>											
33	34	35	36	37	38	39	40	41	42		
Asn	Pro	Lys	Leu	Thr	Arg	Met	Leu	Thr	Phe		
	110				120			130			
AAC	CCG	AAA	CTG	ACG	CGT	ATG	CTG	ACC	TTC		
TTG	GGC	TTT	GAC	TGC	GCA	TAC	GAC	TGG	AAG		

43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
Lys	Phe	Tyr	Met	Pro	Lys	Lys	Ala	Thr	Glu
	140				150			160	
AAA	TTC	TAC	ATG	CCG	AAA	AAA	GCT	ACC	GAA
TTT	AAG	ATG	TAC	GGC	TTT	TTT	CGA	TGG	CTT

53	54	55	56	57	58	59	60	61	62
Leu	Lys	His	Leu	Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Glu
	170				180			190	
CTG	AAA	CAC	CTC	CAG	TGT	CTA	GAA	GAA	GAG
GAC	TTT	GTG	GAG	GTC	ACA	GAT	CTT	CTT	CTC

63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
Leu	Lys	Pro	Leu	Glu	Glu	Val	Leu	Asn	Leu
	200				210			220	
CTG	AAA	CCG	CTG	GAG	GAA	GTT	CTG	AAC	CTG
GAC	TTT	GGC	GAC	CTC	CTT	CAA	GAC	TTG	GAC

73	74	75	76	77	78	79	80	81	82
Ala	Gln	Ser	Lys	Asn	Phe	His	Leu	Arg	Pro
	230				240			250	
GCT	CAG	TCT	AAA	AAT	TTC	CAC	CTG	CGT	CCG
CGA	GTC	AGA	TTT	TTA	AAG	GTG	GAC	GCA	GGC

83	84	85	86	87	88	89	90	91	92
Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Asn	Ile	Asn	Val	Ile
	260				270			280	
CGT	GAC	CTG	ATC	TCT	AAC	ATC	AAC	GTT	ATC
GCA	CTG	GAC	TAG	AGA	TTG	TAG	TTG	CAA	TAG

93	94	95	96	97	98	99	100	101	102
Val	Leu	Glu	Leu	Lys	Gly	Ser	Glu	Thr	Thr
	290				300			310	
GTT	CTG	GAG	CTC	AAA	GGT	TCT	GAA	ACC	ACG
CAA	GAC	CTC	GAG	TTT	CCA	AGA	CTT	TGG	TGC

- 19 -

103	104	105	106	107	108	109	110	111	112
Phe	Met	Cys	Glu	Tyr	Ala	Asp	Glu	Thr	Ala
	320				330			340	
TTC	ATG	TGC	GAA	TAC	GCG	GAC	GAA	ACT	GCG
AAG	TAC	ACG	CTT	ATG	CGC	CTG	CTT	TGA	CGC

113	114	115	116	117	118	119	120	121	122
Thr	Ile	Val	Glu	Phe	Leu	Asn	Arg	Trp	Ile
	350				360			370	
ACG	ATC	GTT	GAA	TTT	CTG	AAC	CGT	TGG	ATC
TGC	TAG	CAA	CTT	AAA	GAC	TTG	GCA	ACC	TAG

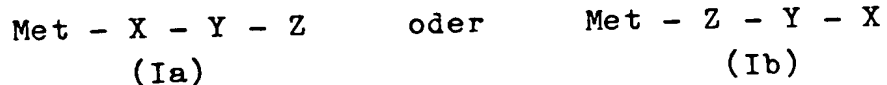
123	124	125	126	127	128	129	130	131	132
Thr	Phe	Cys	Gln	Ser	Ile	Ile	Ser	Thr	Leu
	380				390			400	
ACC	TTC	TGC	CAG	TCG	ATC	ATC	TCT	ACC	CTG
TGG	AAG	ACG	GTC	AGC	TAG	TAG	AGA	TGG	GAC

133	134	135							
Thr									
	410								
ACC	TGA	TAG			3'				
TGG	ACT	ATC	AGC	T	5'				

Patentansprüche:

1. Fusionsprotein, gekennzeichnet durch einen C- oder N-terminalen Anteil, der im wesentlichen den ersten 100 Aminosäuren von Interleukin-2 entspricht.

2. Fusionsprotein der allgemeinen Formel



in der X im wesentlichen die Aminosäurefolge der etwa 100 ersten Aminosäuren des menschlichen Interleukin-2 bedeutet, Y eine direkte Bindung oder ein Brückenglied aus genetisch codierbaren Aminosäuren bedeutet, das die Abspaltung der Aminosäuresequenz Z ermöglicht, vorzugsweise, benachbart zu Z, Met, Cys, Trp, Arg oder Lys enthält oder aus diesen Aminosäuren besteht, insbesondere benachbart zu Z die Aminosäuresequenz

Asp - Pro,

enthält oder aus dieser Sequenz besteht und Z eine Sequenz aus genetisch codierbaren Aminosäuren ist, vorzugsweise von einem Proinsulin oder einem Hirudin.

3. Verfahren zur Herstellung eines Fusionsproteins nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man eine für dieses Protein codierende Genstruktur in einer Wirtszelle exprimiert und das Fusionsprotein, vorzugsweise durch Zentrifugation von den löslichen Proteinen, abtrennt.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Wirtszelle ein Bakterium, vorzugsweise E. coli, ist.

5. Verwendung des Fusionsproteins nach Anspruch 1 oder 2

bzw. der nach Anspruch 3 oder 4 erhaltenen Fusionsproteine zur Herstellung des Proteins, das im wesentlichen der Aminosäuresequenz Z entspricht, durch chemische oder enzymatische Spaltung.

5

6. Genstruktur, codierend für ein Fusionsprotein gemäß Anspruch 1 oder 2.

7. Vektor, enthaltend eine Genstruktur nach Anspruch 6.

10

8. Plasmide pEW 1000, pK360, pK410, pPH30, pPH100, pK370 und pKH101.

9. Wirtszelle, enthaltend einen Vektor nach Anspruch 7.

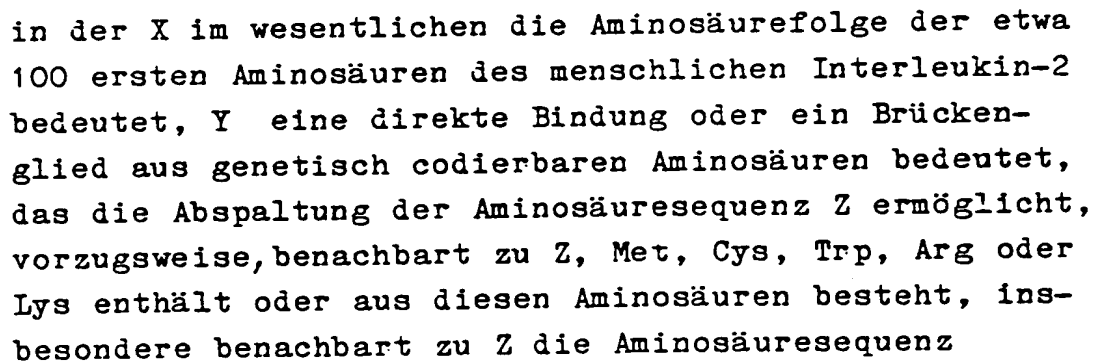
15

10. Hirudinderivate, gekennzeichnet durch eine Aminosäurefolge, die N-terminal mit Pro, vorzugsweise mit Pro-His oder Pro-Thr beginnt.

20 11. Human-IL-2-Derivat, das C-terminal Asp enthält.

12. Fusionsprotein aus Human-IL-2 und Hirudin, das sowohl IL-2-Aktivität als auch Hirudin-Aktivität zeigt.

- ## 2. Fusionsprotein der allgemeinen Formel



Asp - Pro,

enthält oder aus dieser Sequenz besteht und Z eine Sequenz aus genetisch codierbaren Aminosäuren ist, vorzugsweise von einem Proinsulin oder einem Hirudin.

3. Verfahren zur Herstellung eines Fusionsproteins nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß man eine für dieses Protein codierende Genstruktur in einer Wirtszelle exprimiert und das Fusionsprotein, vorzugsweise durch Zentrifugation von den löslichen Proteinen, abtrennt.

- 35 4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Wirtszelle ein Bakterium, vorzugsweise E. coli, ist.

5. Verwendung des Fusionsproteins nach Anspruch 1 oder 2

bzw. der nach Anspruch 3 oder 4 erhaltenen Fusionsproteine zur Herstellung des Proteins, das im wesentlichen der Aminosäuresequenz Z entspricht, durch chemische oder enzymatische Spaltung.

5

6. Genstruktur, codierend für ein Fusionsprotein gemäß Anspruch 1 oder 2.

7. Vektor, enthaltend eine Genstruktur nach Anspruch 6.

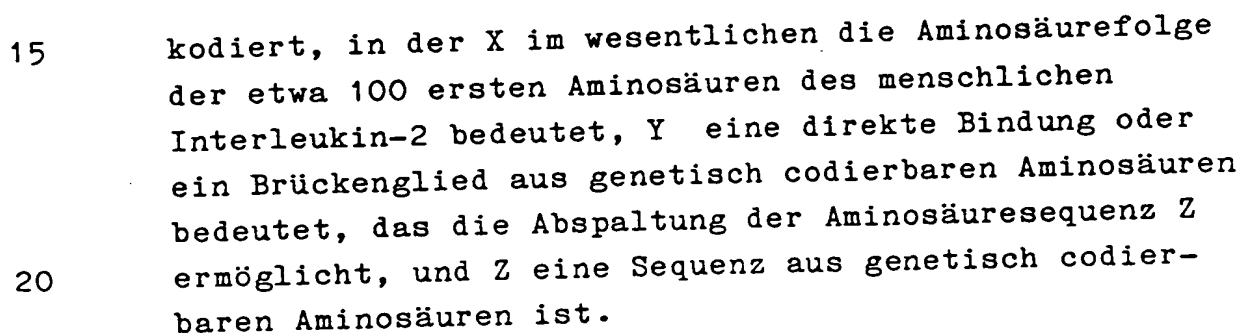
10

8. Plasmide pEW 1000, pK360, pK410, pPH30, pPH100, pK370 und pKH101.

9. Wirtszelle, enthaltend einen Vektor nach Anspruch 7.

--

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß
das Gen für ein Fusionsprotein der allgemeinen Formel



3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß Y, benachbart zu Z, Met, Cys, Trp, Arg oder Lys enthält oder aus diesen Aminosäuren besteht.

4. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß Y, benachbart zu Z, die Aminosäuresequenz

30 Asp - Pro,
enthält oder aus dieser Sequenz besteht.

- 35 5. Verfahren nach einem oder mehreren der vorherge-
henden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß Z die
Aminosäuresequenz von einem Proinsulin oder einem Hi-
rudin bedeutet.

6. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Fusionsprotein durch Zentrifugation von den löslichen Proteinen abgetrennt wird.
- 5
7. Verfahren nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Wirtszelle ein Bakterium ist.
- 10 8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Wirtszelle E. coli ist.
9. Verwendung der nach Anspruch 1 bis 8 erhaltenen Fusionsproteine zur Herstellung des Proteins, das im wesentlichen der Aminosäuresequenz Z entspricht, durch
15 chemische oder enzymatische Spaltung.

1/12

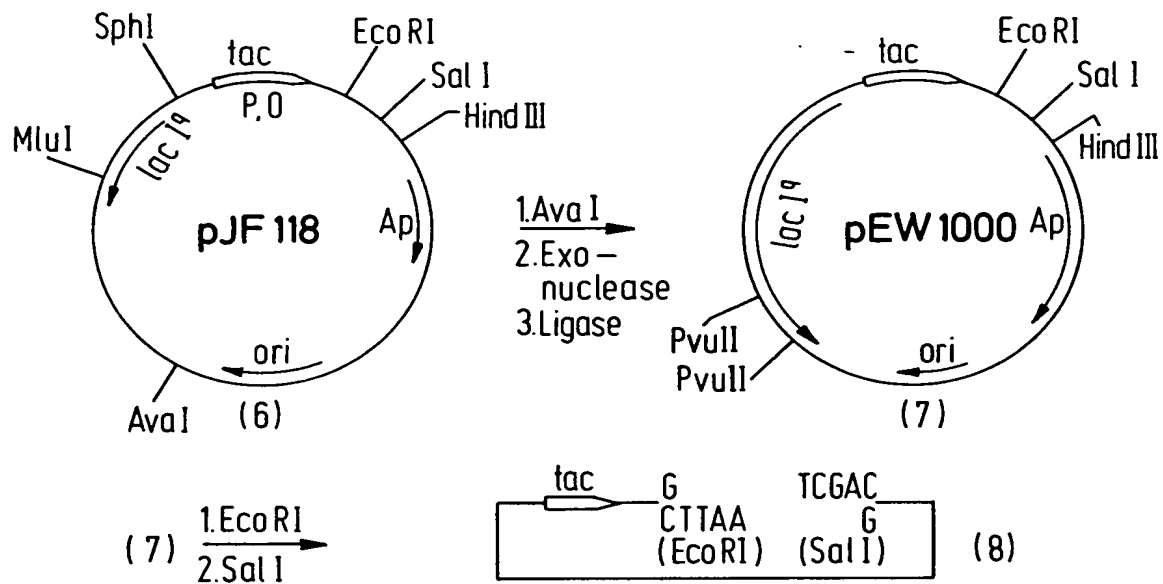
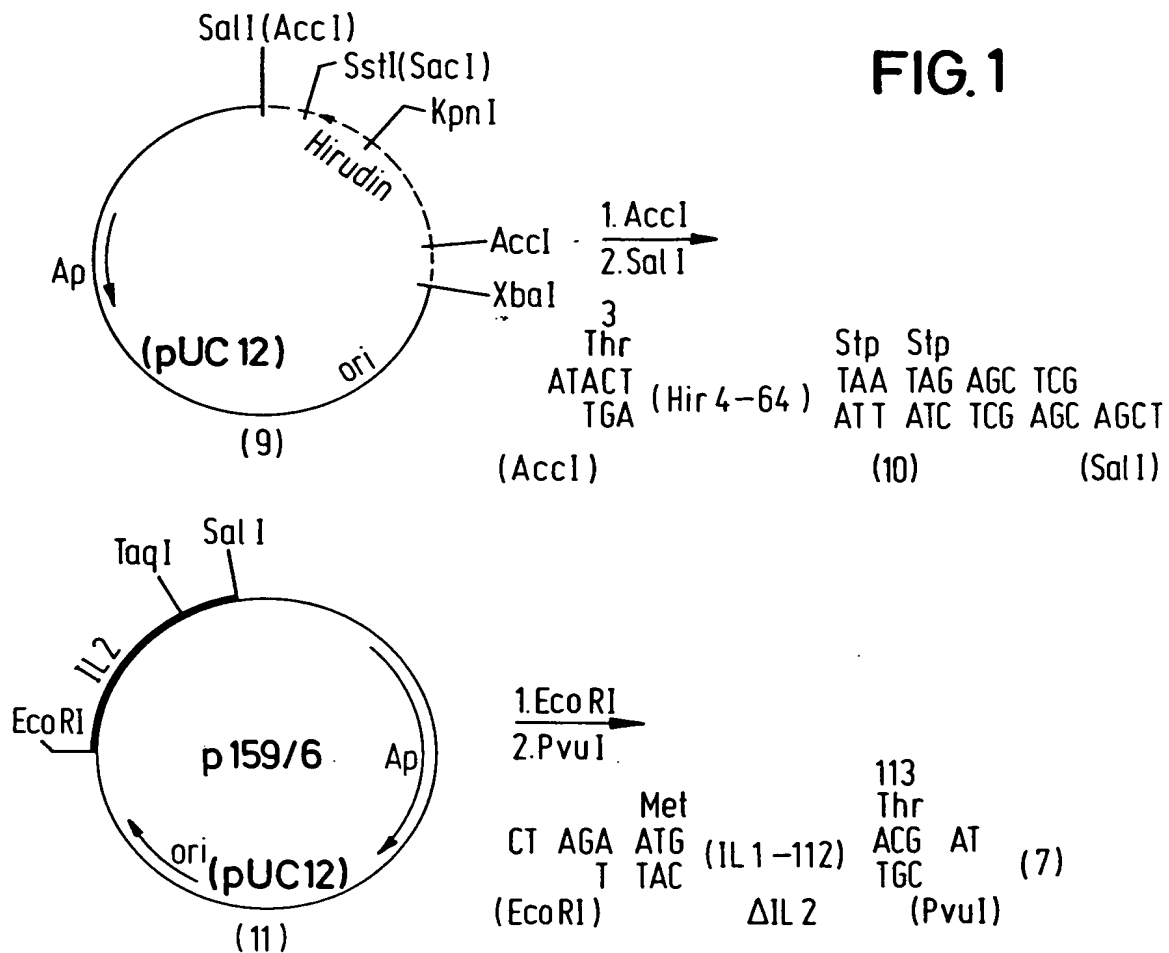


FIG. 1



114	EcoRI					1	2
(Ile)	Asp	Phe	Met	Ile	Thr	Thr	(Tyr)
C	GAA	TTC	ATG	ATC	ACA	ACG	T
TAG	CTT	AAG	TAC	TAG	TGT	TGC	ATA
(PvuI)			(8)			(AccI)	

FIG.1a

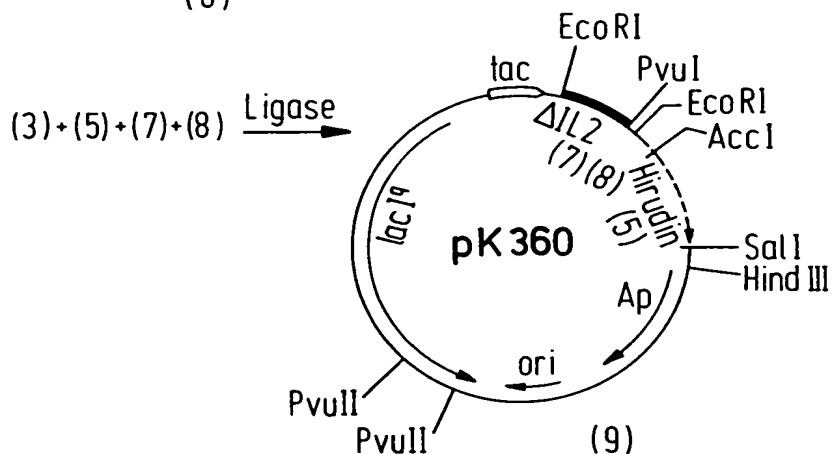
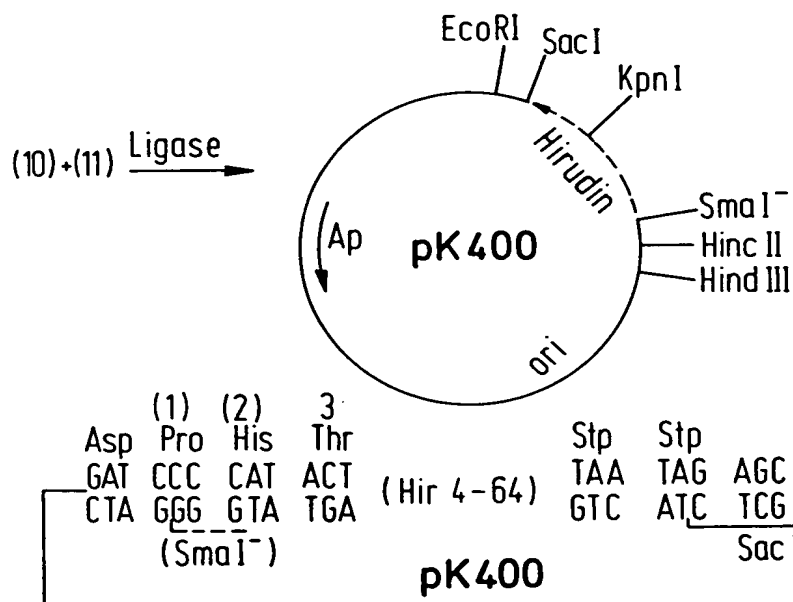
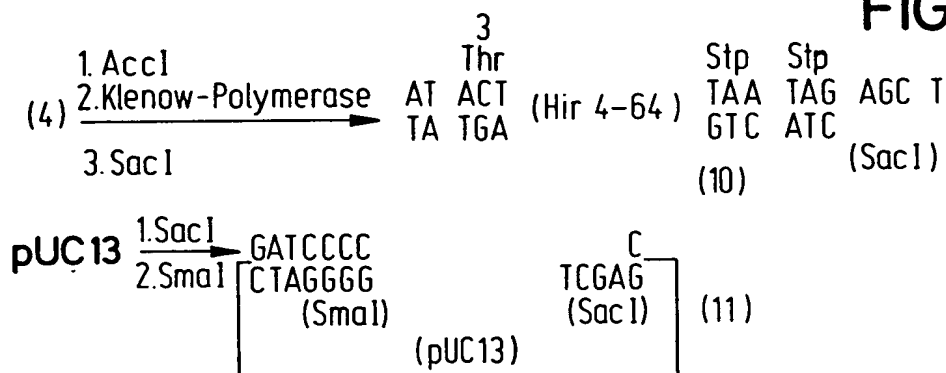


FIG.2



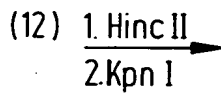
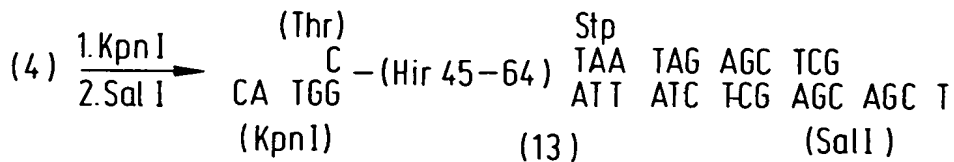
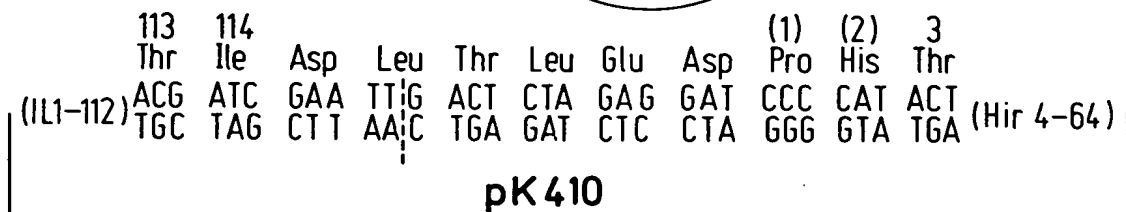
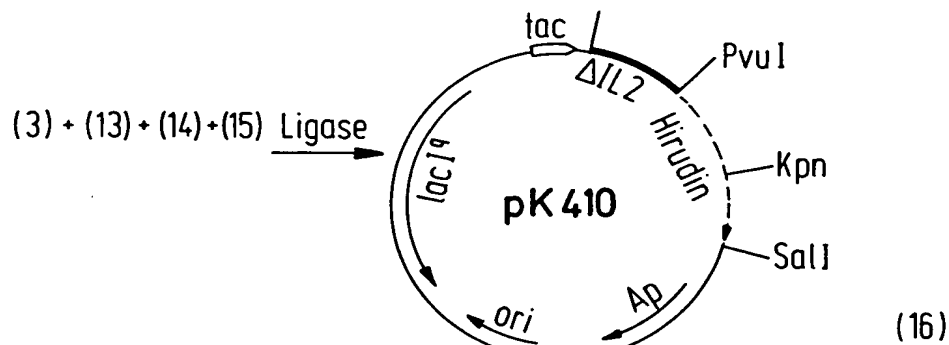
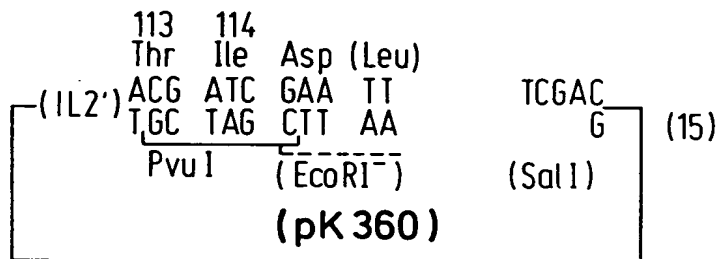
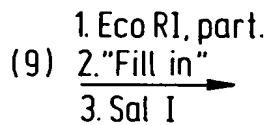
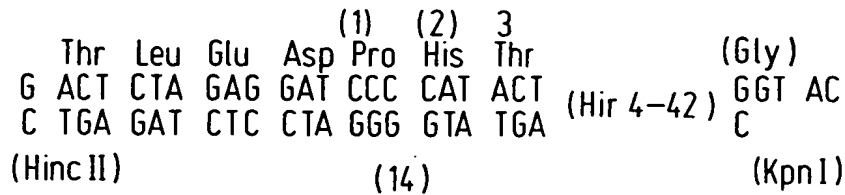
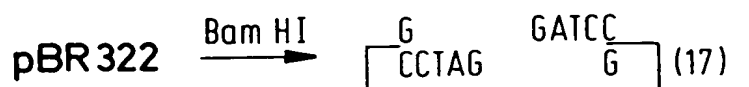


FIG. 2a



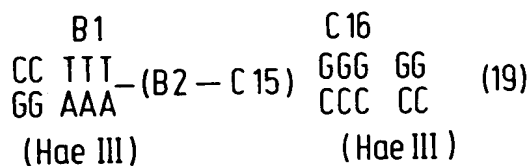
4/12



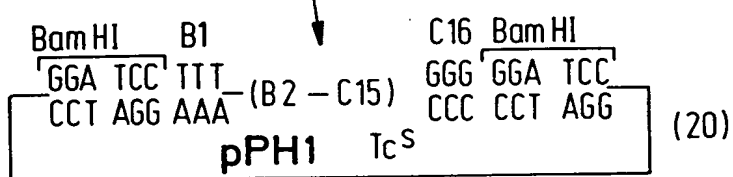
1) dATP, dGTP, dTTP
2) S1-Nuclease



FIG. 3



(18) + (19) $\xrightarrow{\text{Ligase}}$



\downarrow Bam HI
Dde I

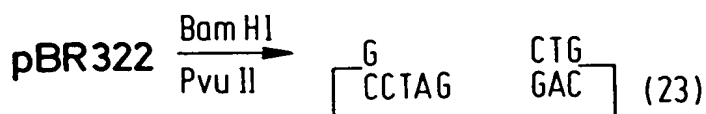
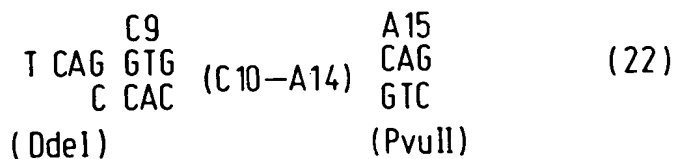
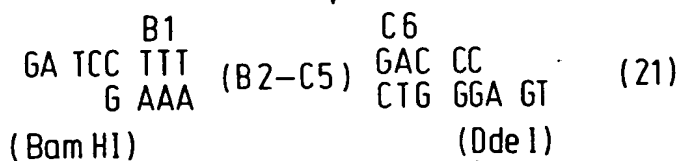
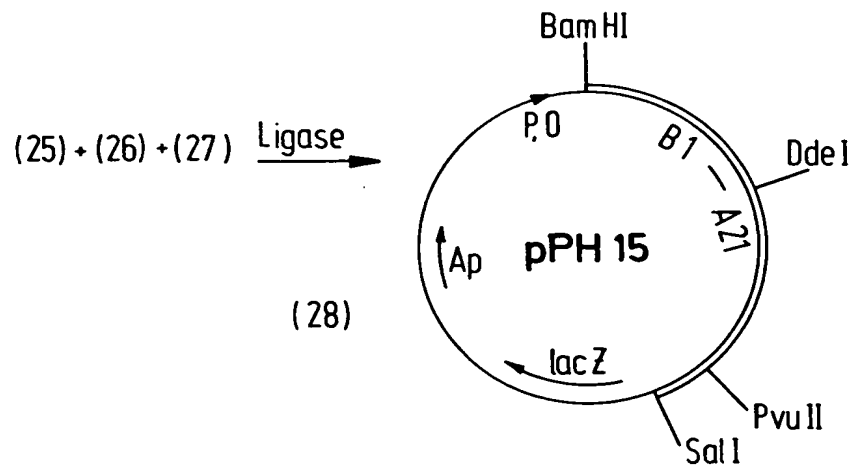
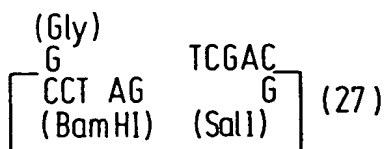
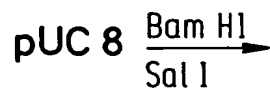
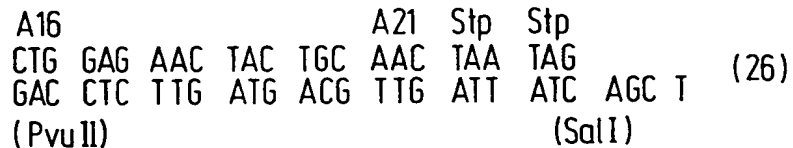
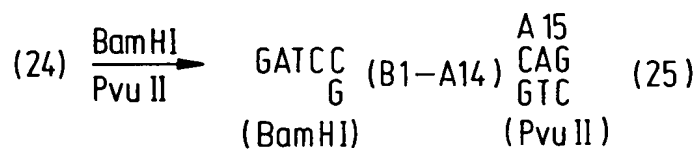
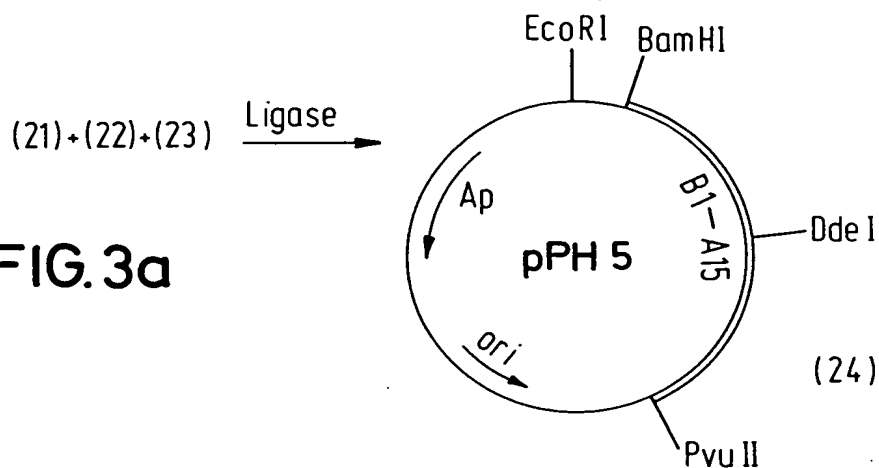
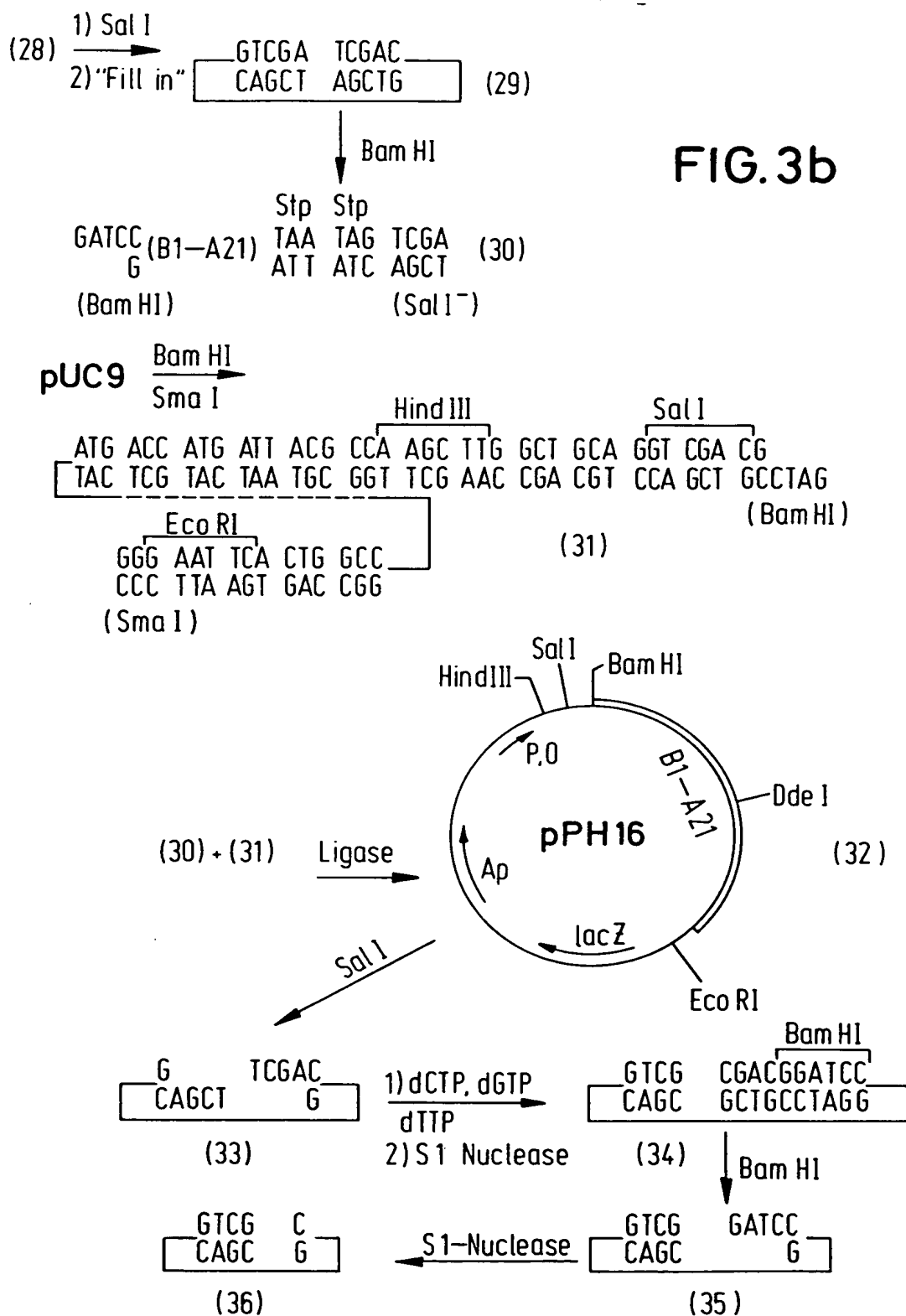


FIG. 3a

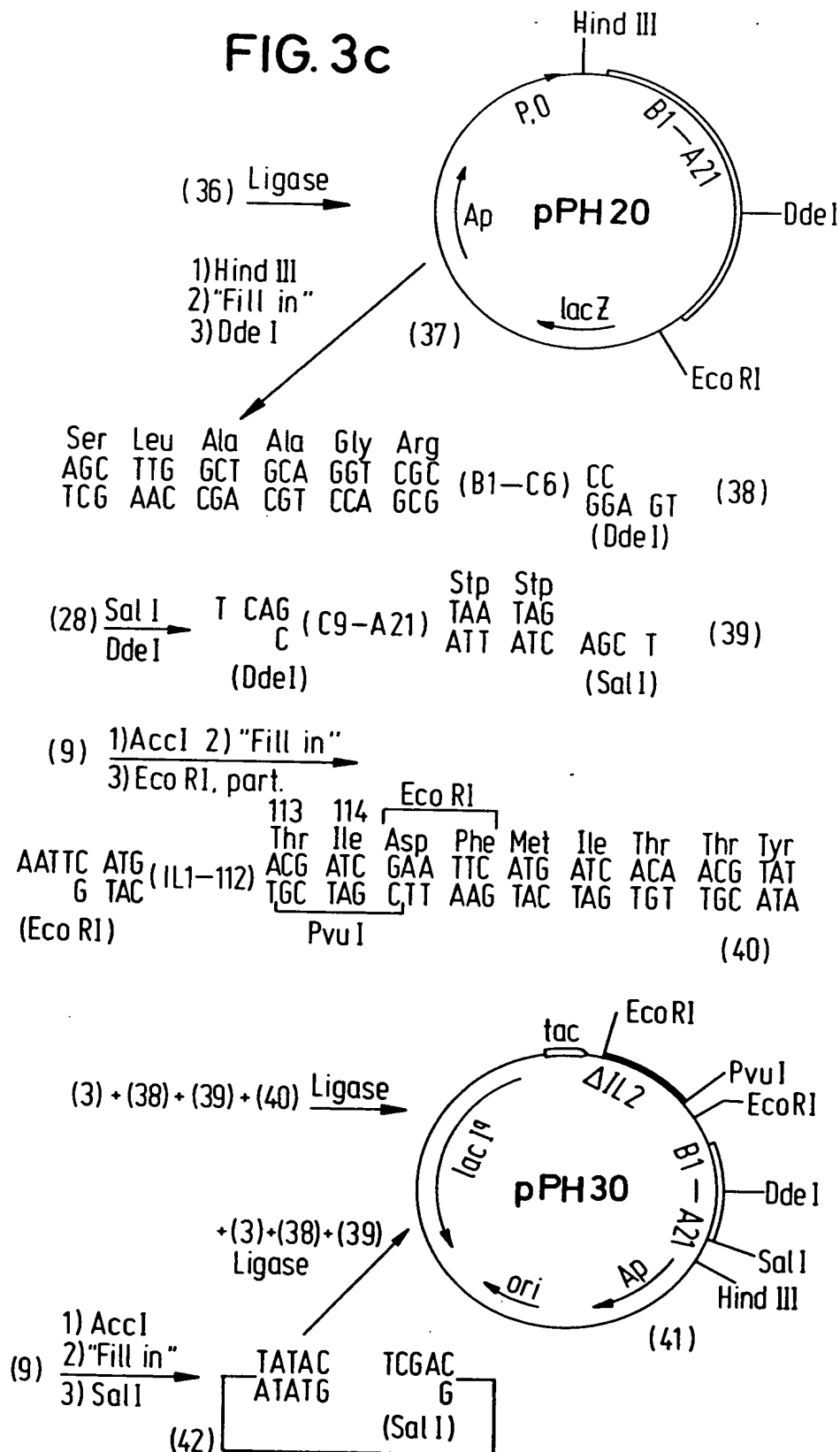


6/12



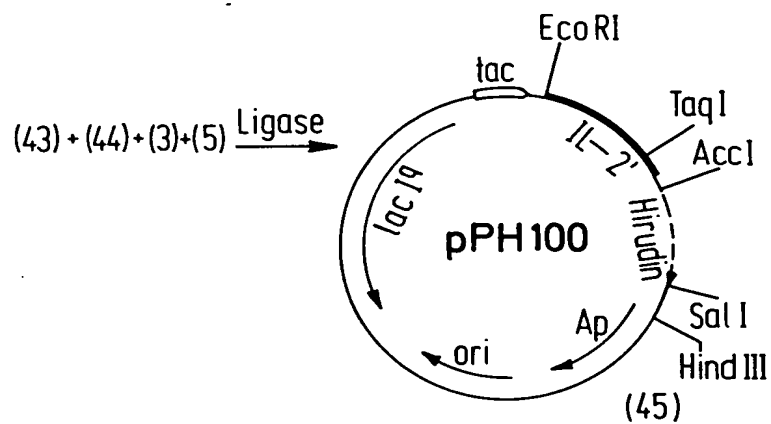
7/12

FIG. 3c



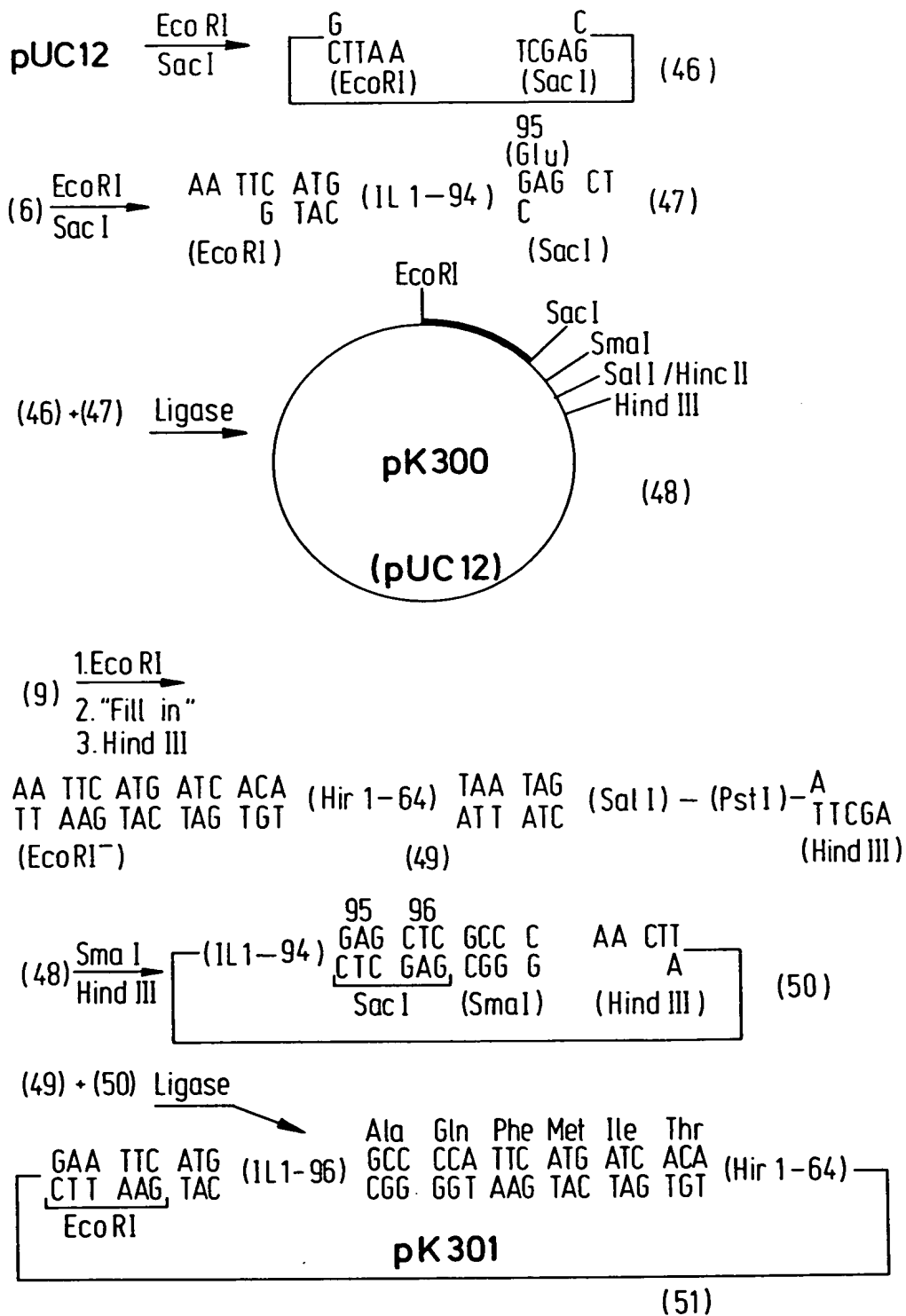
(6) $\xrightarrow[2) \text{EcoRI}]{1) \text{Taq I}}$ AA TTC ATG (IL1-126) (Ser)
G TAC AGC (43)
(EcoRI) (TaqI)

CG Ile Ile Ser Thr Leu Asp (0) 1 2
ATC ATC TCT ACC CTG GAC CCG Thr (Tyr)
TAG TAG AGA TGG GAC CTG GGC TGC ATA (44)
(TaqI) (AccI)



9/12

FIG. 5



(51) EcoRI Hind III

AA TTC ATG GCC CCA TTC ATG ATC ACA
 G TAC CGG GGT AAG TAC TAG TGT

(EcoRI)

(Hir 1-64) Stp Stp
TAA TAG TCG TCG ACC TGC AGC CA
ATT ATC AGC AGC TGG ACG TCG GTT CGA

Sal I Pst I (Hind III)

(52)

(2) EcoRI Hind III

G AGCTT
CTTAA A
(Eco RI) (Hind III)

(53)

(52) + (53) Ligase

pK370

lacIq ori Ap

EcoRI Sac I Sal I/Hinc II Pst I Hind III

$\Delta IL2$ Hirudin

(54)


11 / 12

FIG. 6

(41) $\xrightarrow{\text{EcoRI/Hind III}}$
"Fill in"

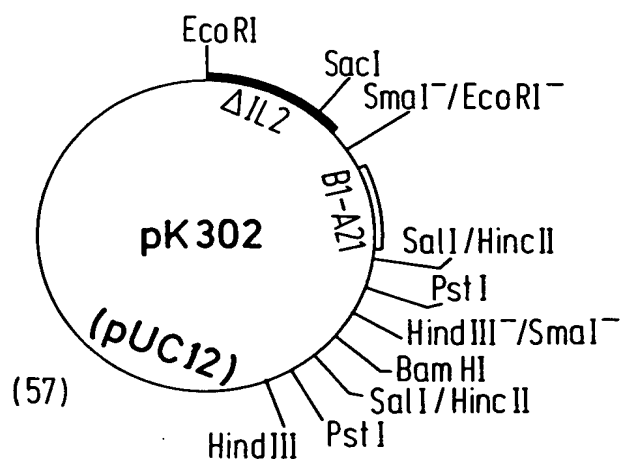
AA TTC ATG ATC ACA ACG TAT AGC TTG GCT GCA GGT CGC
TT AAG TAC TAG TGT TGC ATA TCG AAC CGA CGT CCA GCG
(EcoRI⁻)

(B1-A21) TAA TAG TCG ACC TGC AGC CAG CT
AAT ATC AGC TGG ACG TCG GTC GA (55)
Sal I/Hinc II Pst I (Hind III⁻)

(48) $\frac{\text{Sma I}}{\text{Phosphatase}}$ 

(IL1-94) 95 96
GAG CTC GCC C GG GGA TCC
CTC GAG CGG G CC CCT AGG
SacI (SmaI) BamHI (SmaI) (56)
(pUC12)

(55)+(56) Ligase



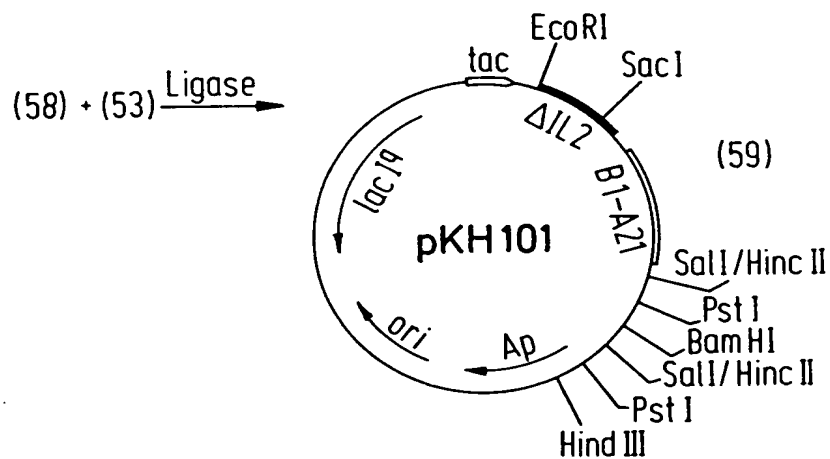
12/12

FIG. 6a

(57) $\xrightarrow[\text{Hind III}]{\text{Eco RI}}$ Eco RI (1L1-96) - Y - (B1-A21) - Hind III (58)

Y =

Ala	Gln	Phe	Met	Ile	Thr	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ala	Ala	Gly	Arg
GCC	CAA	TTC	ATG	ATC	ACA	ACG	TAT	AGC	TTG	GCT	GCA	GGT	CGC
CGG	GTT	AAG	TAC	TAG	TGT	TGC	ATA	TCG	AAC	CGA	GGT	CCA	GCG



0227938

Hoechst AG · Postfach 800320 · D-6230 Frankfurt am Main 80

Europäisches Patentamt
Generaldirektion 1 - Den Haag
P.B. 5818
Patentlaan 2

NL-2280-HV Rijswijk (ZH)

**Hoechst Aktiengesellschaft
Zentrale Patentabteilung**

Postfach 800320 · 6230 Frankfurt am Main 80
Telefon: (069) 305-0 · Telex: 41234 700 ho d
Telegramm: hoechstag frankfurtmain
Fax: infotec (069) 357175

Dresdner Bank AG, Frankfurt am Main 80
(BLZ 50080000) Kto. Nr. 735555500
Commerzbank AG, Frankfurt am Main 80
(BLZ 50040000) Kto. Nr. 2570729
Deutsche Bank AG, Frankfurt am Main 1
(BLZ 50070010) Kto. Nr. 926006
Hessische Landesbank - Girozentrale -
Frankfurt am Main 1
(BLZ 50050000) Kto. Nr. 24100000
Landeszentralbank in Hessen, Frankfurt am Main 1
(BLZ 50000000) Kto. Nr. 50008190
Postgiroamt Frankfurt am Main 1
(BLZ 50010060) Kto. Nr. 1442-605

Ihre Zeichen

Ihre Nachricht vom

Unsere Zeichen
Dr.KL/ml

Telefon Durchwahl
(069) 305- 6031

Frankfurt am Main
4.3.1987

Europäische Patentanmeldung Nr.86116140.4 - HOE 85/F 263
Berichtigung von Mängeln nach Regel 88

Wir überreichen als Anlage in dreifacher Ausfertigung die Zeichnungsblätter 1 und 2, auf denen die folgenden offensichtlichen Fehler berichtigt wurden:

Blatt 1 - Figur 1: Die Bezugsziffern (6) bis (11) wurden berichtigt zu (1) bis (6). Diese logische Reihenfolge ergibt sich an sich von selbst, insbesondere aus der richtigen Zuordnung der Bezugsziffer (7) bei der letzten Formel in der Figur 1. Sie ergibt sich aber auch einwandfrei aus Beispiel 1, nämlich Seite 7, Zeile 24 bis Seite 8, Zeile 22, wo im textlichen Zusammenhang die Zuordnung von Bezugsziffer zu Plasmid bzw. DNA-Fragment einwandfrei gegeben ist.

Blatt 2: Hier wurde in der Figur 2 für das Plasmid pK400 die fehlende Bezugsziffer (12) ergänzt. Auch hier ergibt sich der Fehler aus der logischen Reihenfolge der Bezugsziffern schon von selbst, geht aber auch einwandfrei aus Beispiel 2, insbesondere Seite 9, Zeile 35 bis Seite 10, Zeile 2, hervor.

Wir bitten deshalb, die berichtigten Figuren dem Druck der veröffentlichten Anmeldung und dem späteren Prüfungsverfahren zugrunde zu legen.

HOECHST AKTIENGESSELLSCHAFT

Anlagen

Dr. Meyer-Dulheuer
Dr. Meyer-Dulheuer

Dr. Klein
Dr. Klein

1/12

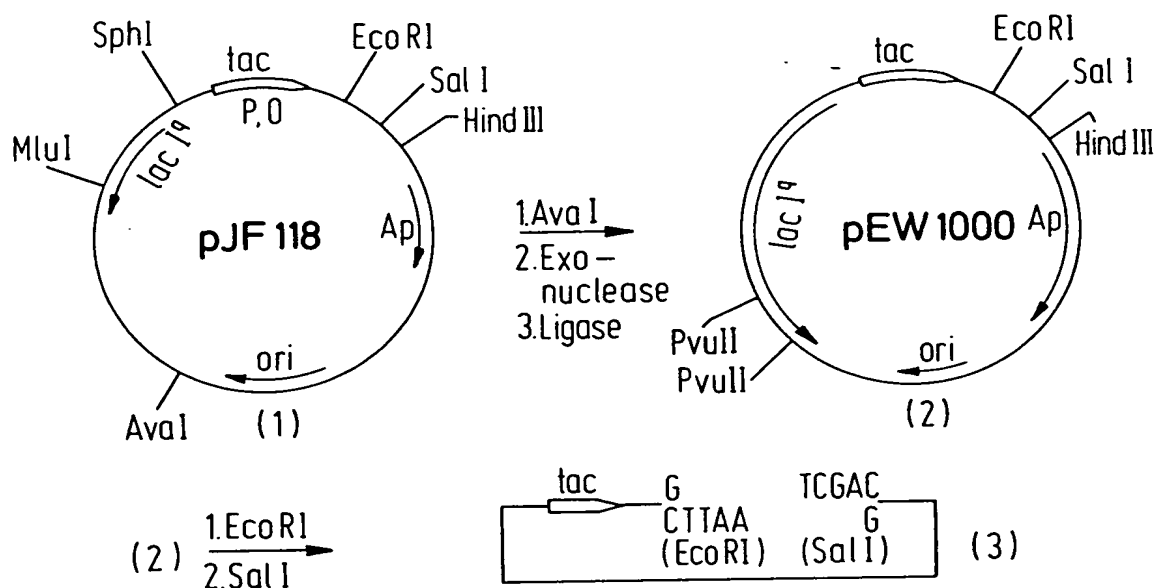
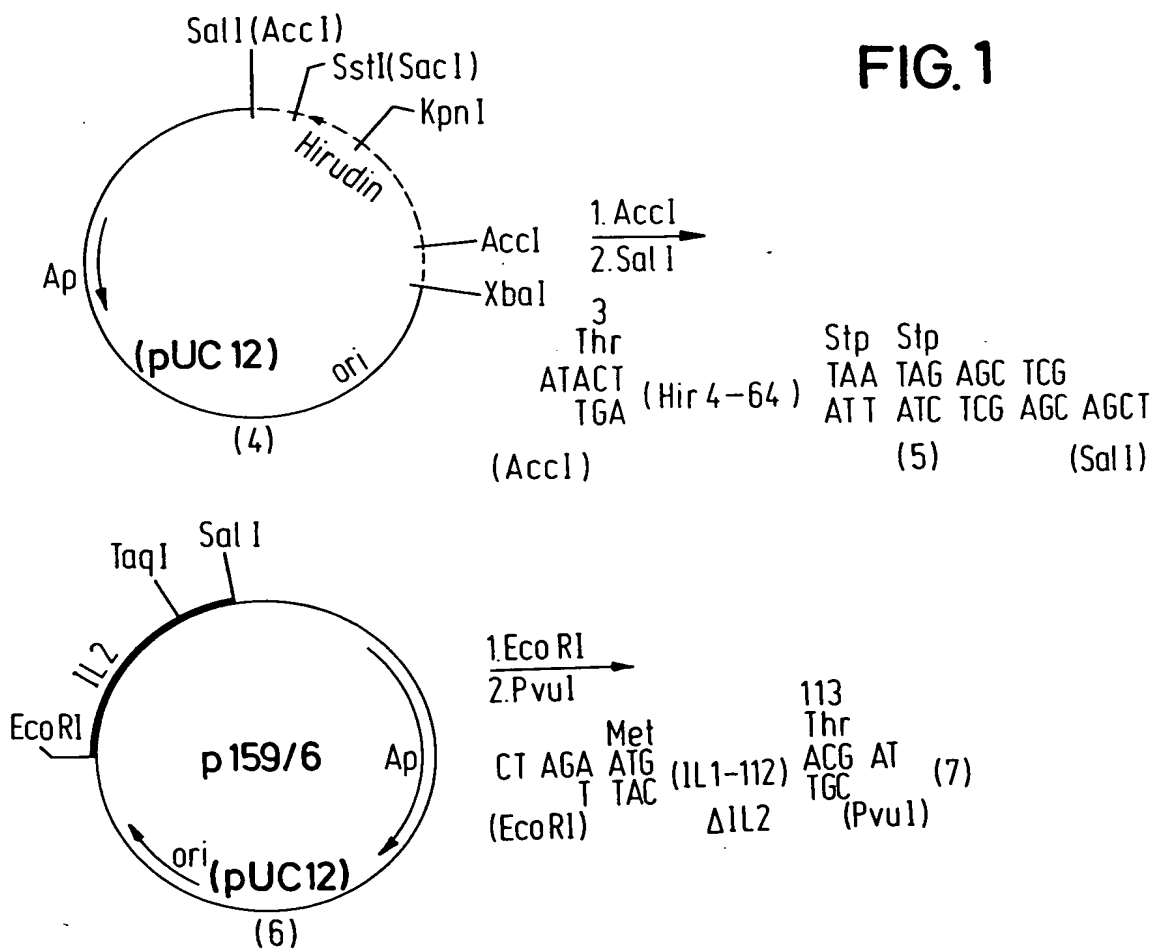


FIG. 1



2/12

114 EcoRI
 (Ile) Asp Phe Met Ile Thr Thr (Tyr)
 C GAA TTC ATG ATC ACA ACG T
 TAG CTT AAG TAC TAG TGT TGC ATA
 (PvuI) (8) (AccI)

FIG.1a

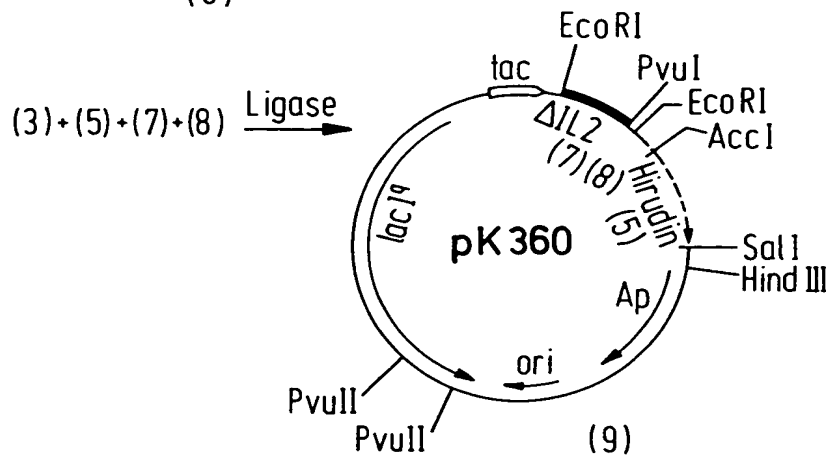
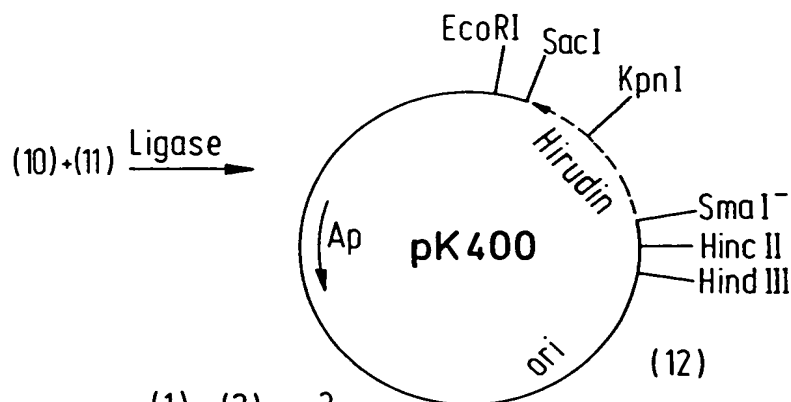


FIG.2

(4) $\xrightarrow[3. \text{SacI}]{1. \text{AccI}, 2. \text{Klenow-Polymerase}}$ 3 Thr
 AT ACT (Hir 4-64) Stp Stp
 TA TGA TAA TAG AGC T
 GTC ATC ATC (SacI)
 (10)

pUC13 $\xrightarrow[2. \text{SmaI}]{1. \text{SacI}}$ GATCCCC
 CTAGGGG (SmaI) C
 TCGAG (SacI) (11)
 (pUC13)



(1) (2) 3
 Asp Pro His Thr
 GAT CCC CAT ACT (Hir 4-64) Stp Stp
 CTA GGG GTA TGA GTC ATC AGC TC
 (SmaI⁻) TCG AG
 SacI
 pK400